

別紙 1

論文審査の要旨

報告番号	㊦・乙 第 2964 号	氏 名	小田中 響
論文審査担当者	主査 教授	美島 健二	
	副査 教授	馬場 一美	
	副査 教授	高見 正道	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Comparison of protein profiles of pellicle, gingival crevicular fluid and saliva: possible origin of pellicle proteins」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>ペリクルは、唾液中のタンパク質が歯面に吸着することで形成される獲得被膜である。本研究では、同一の健康成人からペリクル、歯肉溝浸出液 (GCF)、唾液を採取し、三者のタンパク質パターンを比較することでこれらの口腔内成分の特性とペリクルの由来を明らかにすることを目的とした。健康成人 4 名のペリクル、GCF、耳下腺唾液、混合腺唾液を採取し解析が行われた。その結果、質量分析法 (iTRAQ 法) によりペリクル、GCF、唾液のタンパク質組成に差があることが明らかとなり、また SDS-PAGE と質量分析法により同定したペリクル、GCF、耳下腺唾液、混合腺唾液の主要タンパク質は、それぞれ 13、11、10、10 種類であった。ペリクルと唾液に存在する酸性タンパク質であるシスタチン S と -アミラーゼは、質量分析およびウェスタンブロットでも GCF には検出されず、iTRAQ 法の存在比でも低かった。シスタチン S と -アミラーゼは、唾液由来のペリクルタンパク質であることがわかった。またセロトランスフェリンはペリクルと GCF にのみ認められた。ミエロペルオキシダーゼは、すべてのサンプルに存在したが、GCF に特に多く含まれた。GCF 中の血清タンパク質濃度が唾液中の 70 倍であることから、GCF 由来のタンパク質がペリクル形成に寄与していると考えられる。これまでペリクルは唾液由来であると一般に考えられていたが、唾液および GCF に由来するタンパク質がともに含まれていることが明らかになった。したがって、今日までに報告された GCF の歯周組織における役割に加えて、歯の表面上のペリクル形成においての役割を有する可能性がある。</p> <p>馬場委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. ペリクルに特異的に存在するスタテリンが検出されなかった理由を述べよ。 (SDS-PAGE 分析は、ペリクルゲルパターンにおいて 6kDa に特徴的なバンドを示した。これは、ペリクルに特異的に見出される酸性タンパク質であるスタテリンである可能性が高い可能性があったが (Mayhall, 1970; Zahradnik, 1976; Lee, 2013)、本研究では、MS によってこのタンパク質を同定することを繰り返したが、成功しなかった。考えられる理由としてスタテリンのペプチド配列がアルギニン残基およびリシン残基をほとんど含まないために、MS 分析に適したトリプシン断片を得ることが非常に困難であったためであると考えられる。)</p> <p>2. 4 例をサンプルサイズにした理由を述べよ。 過去のペリクルのタンパク質同定を男女含め 6 名で行っている論文があり (Yao, 2001)、本研究においても</p>			

当初の目的を 5~6 サンプルと考えていたが、4 例でまとめた。また、ウェスタブロット法においても一つのデータのみ載せているが、すべて三回以上実験を行っており十分に再現性があると考えている。)

3. セロトランスフェリンが GCF から検出されたが、特異的な機能を考察せよ。

(血清トランスフェリンとも呼ばれるセロトランスフェリンは、主に肝臓で合成され、鉄イオンと強く結合し、鉄を小腸から肝臓、脾臓、骨髄、そして細胞へと血流に乗って運搬する。また、遊離鉄を吸収して抗菌作用を示す(Mukherjee, 1988)。)

高見委員の質問とそれらに対する回答：

1. ペリクルはブラッシングで容易に除去できないくらいエナメル質と接着しているが、いかなる原理によってそれを剥離、回収したのか。

(本研究では、過去の文献を参考にして 0.5 M 重炭酸Na緩衝液 (pH 9.0) に浸漬した親水性PVDF膜を用いてペリクルタンパクを回収している (Yao, Y *et al*, 2001)。タンパク質はpHの変化によって変性するため、アルカリ性の緩衝液を使用し、主にペリクルに特異的に存在する酸性タンパク質を回収した。)

2. iTRAQ 法を用いた同位体とは具体的に何か。

(iTRAQ 法は、最大 8 サンプルまでのサンプル間でのタンパク質発現量を、網羅的に比較解析することができる。それぞれのサンプル由来のタンパク質は、まず 2、4 または 8 種類の iTRAQ 試薬のいずれかでラベルされる。iTRAQ 試薬は、同じ分子構造ながら異なる安定同位体原子を持つ Reporter Group と、全体の質量が等しくなるよう調節するための Balance Group、ペプチドと結合するための Peptide Reactive Group からなる。質量分析を行う際、異なるサンプル由来のペプチド比を Reporter Group のシグナル強度として検出することで、サンプル間での存在比を調べることができる (Philip L.R *et al*, 2004)。)

3. GCF は 1 日にどれくらいの量が口腔内で分泌されているのか。

(正常部位で 1 時間に 0.3 l/tooth/hr (Lamster, IB *et al*, 1989) のため、1 日だと約 7.2 l/tooth/day となる。)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. 解析における個体差はみとめられなかったのか。

(本実験では、主なタンパク質の被験者別の相対比を示した。ペリクルと他のサンプルとの比率でペリクルに多かったものを赤で示し、少なかったものを青で示した。本文中では比の大小のみで傾向があったものを結果として用いているが数値までは検討されていない。例えば、アルブミンでは、すべての被験者においてGCFのほうがペリクルより多かった傾向がみられたが、被験者 1 では 9 倍で被験者 2 では 2 倍であった。明らかに個体差があることがわかった。本研究では、4 名をサンプルサイズとして行ったが、被験者数を増やしてこのようなばらつきに対しての対策が必要だったと考える。しかし、一人に対してこの実験を三回以上行っており、比の大小の再現性はとれていたため、4 人の被験者のデータに信頼性があると考え論文をまとめた。)

主査の美島委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)